



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 125 814**

⑫ Número de solicitud: 009602678

⑬ Int. Cl.⁶: A01N 47/36

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **18.12.1996**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.1999**

Fecha de concesión: **27.09.1999**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.11.1999**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.11.1999

⑲ Titular/es: **Consejo Superior
Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Camps Díez, Francisco;
Fabrias Domingo, Gemma y
Hernanz Redondo, David**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Ácidos grasos α -alogenados y sus derivados como inhibidores de la producción de feromonas sexuales de insectos.**

㉓ Resumen:

Ácidos grasos α -halogenados y sus derivados como inhibidores de la producción de feromonas sexuales de insectos.

Compuestos de fórmula general $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n \text{CXY}$ COR en la que $n=5-17$, X representa un halógeno F, Cl, Br, I, Y representa un hidrógeno o un halógeno, pudiendo tener en ese último caso el mismo o distinto valor que X, y R representa -OH, -OH₁, donde R₁, es un alquilo o fenilalquilo de cadena lineal o ramificada de 1 a unos 18 átomos de carbono que puede contener una o varias insaturaciones en la cadena -CoA, -SR₂, donde R₂ puede tener el mismo valor que R₁, -N(R₃)₂, donde R₃ es un alquilo de 1 a 6 átomos de carbono. Miembros de esta clase de compuestos han mostrado una extraordinaria actividad en inhibir la producción de feromona sexual de las hembras de diversos insectos, en particular lepidópteros.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 125 814 B1

DESCRIPCION

Acidos grasos α -halogenados y sus derivados como inhibidores de la producción de *feromonas sexuales* de insectos.

5 **Sector de la técnica**

Control de insectos plaga.

10 **Estado de la técnica**

Esta invención se refiere a composiciones y métodos para la inhibición de la producción de feromonas sexuales de insectos, compuestos que regulan el comportamiento sexual y el apareamiento de los insectos.

15 Gran esfuerzo se está dedicando, a nivel mundial, al desarrollo de nuevos métodos biorracionales, compatibles con el medio ambiente, para el control de insectos plaga. Entre ellos, cabe destacar la utilización de feromonas de insectos y otros mensajeros químicos ("semiochemicals") en sus diversas aproximaciones de control del nivel de la plaga ("monitoring") trapeo masivo ("mass trapping") y confusión ("mating disruption"). A pesar de los notables éxitos obtenidos hasta la fecha en la aplicación de feromonas, en
20 laboratorios industriales y de organismos académicos se están estudiando otras alternativas tales como la distupción de la percepción antenal de dichas feromonas. Los pasos importantes implicados en esta percepción incluyen la adsorción de la feromona presente en el aire sobre la superficie de la antena, seguido de la difusión a un receptor que, previa interacción con los componentes de la secreción feromonal, es activado lo que ocasiona un cambio en la conductancia de la membrana y la transducción de la señal. Sin embargo, para que el insecto pueda mantener su orientación dicha señal ha de ser inactivada para
25 que el proceso pueda reiniciarse. Dicha inactivación implica, entre otras cosas, la alteración química de la feromona a una forma inactiva. En aquellos casos en los que la feromona es un ester de un ácido carboxílico, dicha alteración química se logra por una rápida degradación hidrolítica promovida por una carboxilesterasa al alcohol inactivo (Ferkovich et al., J. Chem. Ecol. 8, 859-66 (1984)).

30 Diversos mono, di- y trihaloacetatos y trifluorometilcetonas con estructuras análogas a las feromonas sexuales de diversos insectos (Prestwich and Streinz, J. Chem. Ecol. 14, 1003-21 (1988); (M. Riba et al., Pestic. Sci. 41, 97-103 (1994)) y fosfatos o fosfonatos de alquilo de fórmula general



40 donde R_1 representa $-\text{R}_3$, $-\text{OR}_3$ o $\text{N}(\text{R}_3)_2$, en el que R_3 es una alquilo de 1 a unos 18 átomos de carbono; R_2 representa un alquilo de 1 a unos 18 átomos de carbono; y X representa OR_3 , halógeno, CN , SR_4 o $\text{N}(\text{R}_4)_2$ donde R_4 es un alquilo de 1 a 5 átomos de carbono con la condición que por lo menos uno de los sustituyentes R_2 y R_3 es un grupo alquilo de una feromona (Fukuto et al., US Patent 5,064,820; Nov. 12, 1991) han mostrado ser inhibidores competitivos de las esterasas antenales y por lo tanto son capaces de
45 interferir con la orientación y el apareamiento de una gran variedad de insectos.

Recientemente, en nuestro laboratorio iniciamos un proyecto de investigación para la búsqueda de inhibidores de los diversos enzimas implicados en la biosíntesis de feromonas sexuales de insectos, especialmente de la familia de los lepidópteros. Dentro de dicho proyecto se ha encontrado, mediante la
50 aplicación de trazadores deuterados apropiados, que derivados de ácidos grasos ciclopropénicos inhiben diversas desaturasas en la biosíntesis de las feromonas sexuales en las hembras de *Spodoptera littoralis* y *Thaumetopoea pityocampa* (L. Gosalbo et al. Insect. Biochem. Molec. Biol. 22(7) 687-90 (1992)). Asimismo, las oxidasas, que intervienen en la transformación del ácido palmítico en ácido mirístico en la biosíntesis de la feromona sexual de la *Spodoptera littoralis*, eran inhibidas por diversos derivados
55 halogenados y ciclopropilhalogenados de ácidos grasos (G. Rosell et al. Insect Biochem. Molec. Biol., 22(7) 679-85 (1992)). Sin embargo, en todos estos casos aunque estos derivados inhibían claramente la incorporación de los precursores marcados en los diversos pasos biosintéticos estudiados, no alteraban los niveles de producción de la feromona natural. Este resultado se justificó por no intervenir dichos enzimas en el paso determinante de la biosíntesis afectado por el neuropéptido que regula la biosíntesis (PBAN).
60 En la biosíntesis de la feromona sexual de los insectos indicados se comprobó que la interacción del PBAN habría de producirse sobre los enzimas implicados en los últimos pasos de la secuencia biosintética; reductasas y acil transferasas. (G. Fabriás et al. Arch Insect Biochem. Biophys., 27, 77-87 (1994)).

Es un objetivo de la presente invención proporcionar nuevas composiciones que alteren la producción de la feromona sexual en insectos por interferencia con los enzimas implicados en el paso regulado por el PBAN y proporcionar así un procedimiento específico, no tóxico, de control de insectos plaga, al impedir el acoplamiento, dirigido por aquellos mensajeros químicos, y por lo tanto, la reproducción de dichos insectos.

Descripción detallada de la invención

Los compuestos de la invención se han diseñado para proporcionar un nuevo y seguro medio para el control de insectos por disminución de la producción de feromona natural.

Dicho efecto debería producirse por inhibición de los pasos biosintéticos regulados directamente por el PBAN. Para lograr dicho efecto se han seleccionado los ácidos grasos α -halogenados y derivados, antes indicados, debido a los resultados previos descritos en la literatura [(R.A. Coleman et al., Biochim. Biophys. Acta 1125, 203-9 (1994)] sobre la actividad de derivados del ácido 2-bromopalmítico como inhibidores no selectivos de enzimas de membrana asociadas con el metabolismo de lípidos en mamíferos. Puesto que uno de los tipos de enzimas afectados son las acil transferasas, miembros específicos de la clase de compuestos indicados pueden ser útiles para el control de insectos que utilizan esteroides (en particular, acetatos) como componentes mayoritarios o minoritarios en la composición feromonal de la hembra. Como es bien conocido a todos los que trabajan en este campo, las mezclas de feromonas sexuales de muchos insectos de la familia de los lepidópteros, que constituyen importantes plagas agrícolas o forestales, contienen uno o más esteroides como componentes, especialmente acetatos. Es por ello que la presente invención puede tener una amplia aplicación como se deduce de la extensa bibliografía existente en este campo y de diversas listas de composiciones de feromonas sexuales (Arn et al. List of sex pheromones of lepidoptera and related attractants OILB-SROB/IOBC-WPRS, Paris-France, 1988).

Además, se ha comprobado que los compuestos de la presente invención también inhiben la acción de las reductasas implicadas en la biosíntesis de feromonas sexuales de insectos al impedir la formación de feromonas cuyo constituyente principal es un alcohol y en las que, por tanto, no tiene lugar una reacción de acetilación.

Los compuestos de la invención pueden prepararse por métodos convencionales empleados en síntesis orgánica bien conocidos a los versados en esta disciplina. Dichos compuestos pueden emplearse individualmente o en forma de mezclas de más de un compuesto. Generalmente, la administración de estos compuestos puede llevarse a cabo de manera similar a la empleada para los pesticidas convencionales en disolventes orgánicos, emulsiones en agua o mezclas con soportes sólidos para su actuación por contacto o ingestión. Las dosis utilizadas pueden variar en un amplio intervalo, en general, pueden emplearse cantidades que oscilen entre 10 a 1000 gramos por hectárea, preferentemente entre 250 a 500 gramos. Sin que ello presuponga una limitación en la aplicación de la presente invención, que se define en las reivindicaciones especificadas más adelante, vamos a describir un ejemplo concreto de aplicación.

Ejemplo 1

Inhibición de la producción de feromona natural de Spodoptera littoralis

Una cantidad de $2.9 \cdot 10^{-10}$ a $1.2 \cdot 10^{-7}$ moles de ácido 2-bromopalmítico en $0.1 \mu\text{l}$ de dimetilfulfóxido se aplicaron tópicamente sobre una glándula feromonal de hembras vírgenes de la 2ª fotofase de *Spodoptera littoralis* 1 hora antes de la escotofase. Tres horas más tarde se disectan las glándulas feromonales y se extraen individualmente en un vial con $100 \mu\text{l}$ de hexano conteniendo 10 ng de acetato de tridecilo. Al cabo de 1 hora se retira el tejido glandular del vial y se concentran los $100 \mu\text{l}$ de hexano de cada vial hasta $5 \mu\text{l}$ que se mantienen en un congelador a -40°C hasta el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) utilizando el control de iones individualizados (SIM). A efectos de comparación en los ensayos en blanco se hizo el mismo tratamiento aplicando $0.1 \mu\text{l}$ de metilsulfóxido.

Dichos análisis se llevaron a cabo en un Fisons MD-800 (GC/MS/EI) operando a 70 eV. Se inyectaron las muestras a analizar en splitless. La válvula de purga se abre 0.8 min. después de la inyección. El gas portador es helio y la presión 14 psi. La columna capilar de sílica es una HP-5 "crosslinked" con 5 % de fenilmetilsilicona de una longitud de 25 m y un diámetro interior de 0.20 mm y un espesor de fase de $0.33 \mu\text{m}$. La programación de temperaturas se inició a 80°C durante 1 minuto y se aumentó $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ hasta 280°C manteniéndose a esta temperatura 4 minutos.

ES 2 125 814 B1

Los iones seleccionados fueron m/z 192 y 252 para el componente mayoritario de la feromona natural, acetato de Z-9, E-11-tetradecadienilo, (Z9, E11-140Ac), y m/z 182 y 242 para el standard interno acetato de tridecilo. El porcentaje de inhibición se calculó aplicando la fórmula

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Area controles} - \text{Area tratados}}{\text{Area controles}} \times 100$$

Los resultados obtenidos por aplicación de diversas dosis de ácido 2-bromopalmítico se dan a continuación empleando 10 réplicas en cada experimento:

Dosis:	0.1 μg /glándula	0.5 μg /gl.	1 μg /gl.	10 μg /gl.
% Inhibición	12%	25 %	72 %	80 %

Ejemplo 2

15 *Estudio de la inhibición de producción de feromona de la S. littoralis en tunel de viento*

Se realizó una prueba con machos y hembras de *S. littoralis* de la 2ª escotofase que habían estado en la misma sala de fotoperíodo. Media hora antes del inicio de la escotofase, se aplica a la glándula sexual de las hembras, separadas en dos grupos de n=4, 0.1 μl de DMSO (controles) y 2 ng/g de ácido 2-bromopalmítico en 0.1 μl de DMSO (inhibidos). El ensayo en tunel de viento se realizó 4.5 h. después del inicio de la escotofase y 5 h. después del tratamiento con inhibidor. Se observaron los porcentajes de tres parámetros distintos en los machos expuestos a las hembras control e inhibidas: movimiento de excitación de alas y antenas, vuelo y contacto con la hembra. Los datos obtenidos fueron los siguientes:

<i>machos</i>				
	<i>hembras</i>	alas/antenas	vuelo	contacto
experimento 1	controles	86 % (12/14)	71 % (10/14)	64 % (9/14)
	inhibidos	42 % (5/12)	33 % (4/12)	8 % (1/12)
experimento 2	controles	100 % (12/12)	58 % (7/12)	58 % (7/12)
	inhibidos	40 % (4/10)	20 % (2/10)	20 % (2/10)
experimento 3	controles	100 % (18/18)	77 % (14/18)	61 % (11/18)
	inhibidos	29 % (4/14)	29 % (4/14)	7 % (1/14)
Total 1,2,3	controles	95 % (42/44)	70 % (31/44)	61 % (27/44)
	inhibidos	36 % (13/36)	28 % (10/36)	11 % (4/36)

Como puede observarse, en todos los casos, las hembras tratadas con el inhibidor presentaron una menor atracción sexual indicando que la producción de feromona sexual había disminuido.

45 Ejemplo 3

Inhibición de la producción de feromona de Bombyx mori

El experimento se realizó con hembras de *Bombyx mori* a las que recién emergidas se les ha seccionado la cabeza. Después de 24 hrs. en fotofase para asegurar la no presencia de feromona, los insectos se inmovilizan en una red y sobre la glándula sexual se aplican 10 ng/g de ácido 2-bromopalmítico en 0.1 μl de DMSO (Tratados) y 0.1 μl de DMSO para los insectos de referencia (Controles). Al cabo de 45 min. una vez que la glándula ha absorbido el DMSO y el inhibidor, se sueltan en botes y se inyecta en el abdomen de las hembras 4 pmol de neuropéptido activador de la biosíntesis de feromona (Bom-PBAN) en 10 μl de solución salina Meyer-Miller. Al cabo de 1 h. en fotofase se corta la glándula entera. Se añaden 0.1 ml de hexano y 10 ng de acetato de tridecilo como referencia interna. Se retira la glándula y el extracto orgánico de cada glándula se concentra hasta 4 μl en un vial. Se analizan 2 μl de cada extracto glandular en CG/EM y se mira la relación entre los iones 238 de la feromona natural (E,Z-hexadeca-10,12-dien-1-ol) y 182 correspondiente al patrón interno (acetato de tridecilo).

Se observó un porcentaje de inhibición del 95.4 ± 2.7 en la producción de feromona.

De la anterior descripción, una persona experta en la técnica puede captar fácilmente las características esenciales de la invención y, sin separarse del espíritu y del campo de aplicación, adaptarla a diversos usos y condiciones.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Acidos grasos α -halogenados y sus derivados como inhibidores de la producción de *feromonas sexuales* de insectos **caracterizados** por la fórmula general I

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n \text{ CXY COR}$ en la que $n = 5-17$, X representa un halógeno (F, Cl, Br, I) Y representa un hidrógeno o un halógeno, pudiendo tener en este último caso el mismo o distintos valores que X, y R representa -OH, -OR₁, donde R₁ es un alquilo o fenilalquilo de cadena lineal o ramificado de 1 a unos 18 átomos de carbono que puede contener una o varias insaturaciones en la cadena, CoA-SR₂ donde R₂ puede tener el mismo valor que R₁, -N(R₃)₂, donde R₃ es un alquilo de 1 a unos 6 átomos de carbono.

2. Acidos grasos según reivindicación 1, donde X es bromo e Y hidrógeno.

3. Acidos grasos según reivindicación 1, donde X e Y son bromo.

4. Procedimiento para inhibición de la producción de feromona sexual de insectos, **caracterizado** por la aplicación de formulaciones conteniendo por lo menos uno de los compuestos de fórmula general I, preparadas según las técnicas usuales en el campo de pesticidas convencionales.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 en el que se emplean dos o más compuestos de fórmula general I.

6. Procedimiento según la reivindicación 4 en el que la administración se lleva a cabo en disolución.

7. Procedimiento según la reivindicación 4 en el que la administración se lleva a cabo en suspensión acuosa.

8. Procedimiento según la reivindicación 4 en el que la administración se lleva a cabo en suspensión sólida.

9. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la administración se lleva a cabo a unas dosis de 10 a 1000 gramos por hectárea.

10. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la administración se lleva a cabo, preferentemente, a una dosis de 250 a 500 gramos por hectárea.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes en el que el ácido graso halogenado o sus derivados son compuestos quirales.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 125 814
⑫ N.º solicitud: 9602678
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 18.12.96
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A01N 47/36

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DELGADO, A. et al.: "Synthesis of potential inhibitors of the biosynthesis of the sex pheromone of <i>Spodoptera littoralis</i> . Part I: Monofluorinated fatty acids", Chemistry and Physics of Lipids, 1991, Vol. 59, páginas 127-135; todo el documento.	1,2,4-8, 11
X	ROSELL, G. et al.: "Inhibition of a chain shortening step in the biosynthesis of the sex pheromone of the Egyptian armyworm <i>Spodoptera littoralis</i> ", Insect. Biochem. Molec. Biol., 1992, Vol. 22 (7), páginas 679-685; todo el documento.	1,2,4-8, 11
X	BOSCH, M.P. et al.: "Difluoropalmitic acids as a potential inhibitors of the biosynthesis of the sex pheromone of the Egyptian armyworm <i>Spodoptera littoralis</i> -IV", Bioorganic & Medicinal Chemistry, marzo 1996, Vol. 4 (3), páginas 467-472; todo el documento.	1,4-8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
20.01.99

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1